

| (51)Int.Cl. | 発明記号  | 庁内整理番号    | F I | 技術表示箇所 |
|-------------|-------|-----------|-----|--------|
| C12N 1/16   |       | G 7235-4B |     |        |
| C12G 3/02   | 119 G |           |     |        |
| [(C12N 1/16 |       |           |     |        |
| C12R 1:865) |       |           |     |        |

請求項の数2(全 8 頁)

|          |                  |         |   |
|----------|------------------|---------|---|
| (21)出願番号 | 特願平2-60578       | (71)出願人 | 999999999<br>大関株式会社<br>兵庫県西宮市今津出在家町4番9号 |
| (22)出願日  | 平成2年(1990)3月12日  | (71)出願人 | 999999999<br>国税庁長官<br>東京都千代田区蔵前3丁目1番1号  |
| (65)公開番号 | 特開平3-262473      | (72)発明者 | 徳野 泰治<br>兵庫県西宮市今津社前町4番27-104号           |
| (42)公開日  | 平成3年(1991)11月22日 | (72)発明者 | 北本 隆ひこ<br>東京都新宿区百人町3丁目19番1-810号         |
| 発明の受託番号  | FERM P-11269     | (72)発明者 | 大隅 良兵<br>東京都調布市柴崎1丁目68番3号               |
|          |                  | (72)発明者 | 鹿井 史子<br>大阪府羽曳野市菅田6丁目1番3号               |
|          |                  | (74)代理人 | 弁護士 青山 泰 (外1名)                          |
|          |                  | 審査官     | 田中 久直                                   |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生理活性成分を抽出する酵母および該酵母を用いる酒類の製法

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞形成能を欠損し、物質輸送変異または浸透圧感受性を有し、かつ醸造適性を備えた酵母、

【請求項2】 請求項第(1)項記載の酵母を用いてアルコール発酵を行い、生理活性成分含量を高めた酒類を得ることを特徴とする酒類の製法。

【発明の詳細な説明】

産業上の利用分野

本発明は生理活性成分、ことにグルタチオンを菌体外に抽出する新規な酵母および該酵母を用いる新規な酒類の製造に関する。さらに詳しくは、酵母菌体内で生産され、通常は菌体内で貯蔵、消費されるグルタチオン等の生理活性成分を菌体外に抽出し、かつ醸造適性を有する酵母、ならびに該酵母を用いてアルコール発酵を行い、グルタチオン等の生理活性成分の含量の高い酒類を製造

2

する方法に関する。

従来の技術

グルタチオンは3種のアミノ酸、グルタミン酸、システインおよびグリシンが縮合した生理活性ペプチドであって、動植物の細胞に広く分布し、生体内で解毒作用および酸化還元平衡作用に関与している。この生理活性作用に着目してグルタチオンはアルコール性脂肪肝の溶媒剤など肝臓疾患治療剤として広く用いられてきた。

一方、近年、健康志向の観点より機能性食品が脚光を浴びるに至り、食品の分野においてもグルタチオンの生理活性作用に基づき、グルタチオン含有食品が注目され始めている。しかしながら、酒類においてはグルタチオンを含有するものは現在ほとんどなく、たとえ、グルタチオンを含有していても通常その量は1ppm以下と少ない。これは、以下のような事情による。

すなわち、第1に、酵母自体はグルタチオン生産能力を有するが、柑屑型、卵型のいわゆる酵母型の形態を保つ酵母細胞の外面は緻密な細胞壁と細胞膜で覆われており、生産されたグルタチオンは菌体外への流出が制限されている。第2に、グルタチオンを細胞内で発酵生産させ、選択的に細胞外へ流出させる方法としては、サッカロマイセス・グリオキザールフィラス (*Saccharomyces glyoxyphilus*) (特開昭53-94088号)、カンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*) AQ33 (特開昭8-1452974号) を用いる方法などが提案されているが、これらの方法はいずれもグルタチオンの製造自体に重点が置かれたものであり、用いられる酵母類は醸造のための適切な発酵能を有するものではない。さらに、醸造においては酒税法の規制により製造方法および添加物が制約されている関係上、これらの方法などを応用することはできない。この間の事情は他の生体活性成分についても同様である。

従って、グルタチオン等の生体活性成分を含む酒類を取って製造しようとするれば、別途に製造した生体活性成分を酒類に添加するか、またはアルコールによる自己消化などにより、醸造工程で酒中の酵母を人為的に自己消化させ、グルタチオンを菌体外に流出させるしかなかった。しかしながら、前者の方法は酒税法による制約のため適切でなく、また、後者の方法では自己消化臭などにより酒類の品質を著しく低下させてしまう。

発明が解決しようとする課題

かかる事情により、従来、グルタチオン等の有用な生体活性成分を多く含有する酒類の醸造は実現できなかった。

そこで、酒税法上の問題なく、通常の酒類の仕込み方法が適用でき、かつグルタチオン等の生体活性成分を多く含み、品質においても通常品と比べて遜色の無い酒類が得られる新しい製法の出現が望まれてきた。

本発明者は、このような要望に答えるべく、生体活性成分含有酒類の製法を鋭意研究した。

課題を解決するための手段

従来、酵母では、菌体内で生産された成分は通常の培養では菌体外に放出され難い。また、グルタチオンなどの特定の成分は、菌体内で生産、貯蔵され、必要に応じて菌体内で分解、利用される。従って、第1に、目的成分を菌体外に十分量放出させるためには、菌体内における該成分の分解を抑制する必要がある。第2に、目的成分を菌体外に放出し、かつ、アルコール発酵性も同時に有するような酒類醸造適性を兼ね備えた酵母を開発する必要があり、しかも該放出は自然に行われ、通常の酒類製造工程が適用できる酵母が望ましい。

そこで、本発明者は、まず、酵母菌体内の生体活性成分の1つであるグルタチオンに着目し、グルタチオン分解酵素である $\gamma$ -グルタミルトランスベータゼが存在し、グルタチオンの貯蔵および分解が行われる器官の

1つである液胞を形成しない菌株の育種を試みた。液胞形成能欠損株を選択したのは、液胞欠損により菌体内での物質の輸送系に異常をきたしグルタチオンを菌体外に漏出することが予想され、さらに、液胞が形成されないことにより菌体内外の浸透圧に対して感受性となり、生育過程で菌体が崩壊して他の有用生体活性成分が放出することも考えられたからである。

液胞形成能欠損株としては、本発明者らの1人である北村らの方法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriol.), 170, 2587 (1988)] により得られるサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) KL-197-128 を出発株とした。このKL-197-128は、調べてみると、後記参考例1に示したごとく従来の醸造用酵母に比べて増殖速度および発酵力が極めて低く、酒類の醸造適性を有しないことが判明した。そこで、醸造用酵母 (協会酵母7号、以下K-7という) を変換株として用い、戻し交配を行って醸造適性を高めることを試みた。

かかる戻し交配の結果、増殖能力、発酵能力、さらには、グルタチオン等の菌体内生体活性成分の漏出性および醸造酒の品質の面においても満足できる酵母が得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、液胞形成能を欠損し、物質輸送異常または浸透圧感受性を有し、かつ発酵能および生育能などの醸造適性を備えた新規な酵母を提供するものである。また、かかる酵母を用いてアルコール発酵を行い、生体活性成分含量を高めた酒類を得ることを特徴とする酒類の製法も提供する。

かくして、本発明の酵母はサッカロマイセス・セレビシエの液胞形成能欠損株と醸造用酵母を公知の方法に従って戻し交配し、得られた菌株を、発酵能、増殖能およびグルタチオン漏出能についてスクリーニングし、優良株を選抜することによって得られる。

用いる液胞形成能欠損株としては、前期のKL-197-128が挙げられるが、これに限定するものではなく、例えば、前述北村らの方法に従って公知のサッカロマイセス・セレビシエ株の液胞形成能欠損株としたものでもよい。

また、醸造用酵母株も、K-7に限定するものではなく、他の酒類酵母およびワイン酵母、ビール酵母など、公知の醸造用酵母株が使用できる。

得られた酵母は継代により、その特性を安定に保持することができ、これを用いて、通常の醸造工程により、酒類を得ることができる。例えば、米または雑穀を麹または酵素と共にアルコール発酵させるのに該酵母を用いることができ、例えば、グルタチオンを15~20ppm程度と、従来の酒類より著しく多量に含有する酒類が得られる。

実施例

以下に参考例および実施例を上げて本発明をさらに詳し

く説明する。

参考例1 グルタチオンを菌体外に漏出する

KL-197-12Bの性質

寒地選定の米麹に汲水配合25%の水を加え、50℃で16時間培養し、次いで遠心分離することによって得た上澄み液を経計培養地(No5.9)として用い、この培養地100mlにサッカロマイセス・セレビシエKL-197-12Bおよびサッカロマイセス・セレビシエK-7を各々 $2 \times 10^8$ 個植菌し、15℃で静置培養し、グルタチオン漏出量の経時変化を測定した。

なお、グルタチオン量の測定はチュツェ(Tetzel)法(以下、グルタチオン量の測定はこの方法による)により、他の成分量の測定は国検所所定分析法により行った。また、死滅率は顕微鏡下メチレンブルー染色法により求めた。

第 1 表

| 菌株         | 測定区分        | 0時間  | 22時間 | 46時間 | 70時間  |
|------------|-------------|------|------|------|-------|
| KL-197-12B | グルタチオン (μM) | 1.57 | 5.66 | 8.26 | 10.61 |
|            | アミノ酸度 (mM)  | 1.77 | 1.50 | 1.28 | 1.10  |
|            | アルコール (%)   | 0.18 | 0.98 | 2.45 | 3.43  |
|            | 死滅率 (%)     | 0    | 1    | 2    | 3     |
| K-7        | グルタチオン (μM) | 0.41 | 0.32 | 0.61 | 1.56  |
|            | アミノ酸度 (mM)  | 1.78 | 1.15 | 0.82 | 0.57  |
|            | アルコール (%)   | 0.12 | 1.87 | 2.56 | 4.19  |
|            | 死滅率 (%)     | 0    | 0    | 2    | 2     |

第1表に示すごとく、KL-197-12BではK-7とは異なり、培養の時間経過と共にグルタチオンの菌体外漏出量が増加した。また、同菌の死滅率は高くなく、培養初期からグルタチオンを漏出していることより、グルタチオンの漏出は菌体の自己消化によるものではなく、菌体内の物質輸送の異常によるものと考えられた。

しかしながら、第1表より明らかなごとく、KL-197-12B

第 2 表 振 盪 培 養 速 度

|        | 5時間  | 7    | 9    | 11   | 13   | 16   | 17   | 19   | 21   | 23   |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| No.133 | 0.01 | 0.03 | 0.09 | 0.23 | 0.35 | 0.64 | 0.70 | 0.77 | 0.80 | 0.92 |
| KL-12B | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.05 | 0.06 | 0.21 | 0.27 | 0.41 | 0.58 | 0.68 |
| K-7    | 0.01 | 0.07 | 0.20 | 0.39 | 0.52 | 0.78 | 0.79 | 0.83 | 0.89 | 0.90 |

表中、「KL-12B」はKL-197-12Bを表す(以下、同じ)。

\* 26はK-7に比べると菌の生育およびアルコール生成能に劣り、醸造適性を有するものではない。そこで、前記したごとく、K-7との戻し交配を行ったところグルタチオン漏出能を保持しつつKL-197-12Bに醸造適性が付与されたのである。

実験例1

以下に示す手順により、醸造形成能欠損株KL-197-12Bを供与親、酒造酵母K-7を反復親として戻し交配を繰り返した。

- 1) K-7から単相体株(K-7-H-5、接合型αおよびK-7-H-6、接合型α)を分離し、反復親とする。
- 2) KL-197-12B(接合型α)とK-7-H-6とを交配して1代目雑種を得る。
- 3) 1代目雑種から単相体を分離し、その中から液形形成能がなく、発酵能が良い株を選抜する。
- 4) 選抜株の接合型を決定する。
- 5) 選抜株とその接合型に適合するK-7単相体株との戻し交配を行って2代目雑種を得る。

- 6) 以下、同様にして戻し交配を繰り返す。
- 戻し交配の結果、液形形成能が欠損し、かつ発酵能が付与された優良株を選抜し、サッカロマイセス・セレビシエNo.133(以下、No.133という)を得た。

このNo.133株は、平成2年2月8日、登録番号FERM P-11269の下に工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した。

このNo.133株の菌特性を以下に述べる。

No.133株の増殖速度

菌株No.133および親株をYPD液体培養地(バクトーイイストエキストラクト1%、バクトーヘプトン2%、グルコース2%、以下同じ)7mlに各々 $7 \times 10^8$ 個植菌し、25℃で振盪培養および静置培養を行い、濁度計で培養液の濁度(OD<sub>600</sub>)を経時的に測定することによって増殖速度を測定した。結果を第2表および第3表に示す。

## 表 3 発 酵 増 殖 速 度

|        | 3時間  | 9    | 11   | 16   | 19   | 21   | 27   | 30   | 32   |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| No.133 | 0.00 | 0.04 | 0.08 | 0.19 | 0.37 | 0.39 | 0.54 | 0.59 | 0.60 |
| KI-12B | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.13 | 0.22 | 0.36 | 0.38 | 0.40 | 0.43 |
| K-7    | 0.00 | 0.10 | 0.16 | 0.43 | 0.52 | 0.55 | 0.60 | 0.64 | 0.68 |

第2表および第3表より、本発明の酵母菌株No.133は同親株の中間の増殖速度を有していることが判明した。

アルコール生成に及ぼすグルコース濃度の影響  
No.133と同親株を2〜20%のグルコースを含むYPD液体培地中に各 $1 \times 10^6$ 個菌を、25°Cで7日間培養を行い、アルコール生成に及ぼすグルコース濃度の影響を調べた。生育は発生するCO<sub>2</sub>ガスの減少量により観察し、アルコール生成量は培養終了後の濾液を試料としてガスクロマトグラフィー法により測定した。

第 4 表

No.133

|     | 1日    | 2     | 3     | 5     | 6     | アルコール (%) |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| 2%  | 0.024 | 0.049 | 0.073 | 0.100 | 0.113 | 1.17      |
| 5%  | 0.023 | 0.069 | 0.115 | 0.178 | 0.199 | 2.60      |
| 10% | 0.033 | 0.084 | 0.178 | 0.230 | 0.340 | 5.21      |
| 20% | 0.023 | 0.070 | 0.150 | 0.300 | 0.360 | 5.87      |

KI-197-12B

|     | 1日    | 2     | 3     | 5     | 6     | アルコール (%) |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| 2%  | 0.020 | 0.047 | 0.072 | 0.101 | 0.116 | 1.33      |
| 5%  | 0.025 | 0.065 | 0.110 | 0.182 | 0.215 | 2.78      |
| 10% | 0.025 | 0.065 | 0.122 | 0.223 | 0.274 | 4.28      |
| 20% | 0.014 | 0.046 | 0.100 | 0.210 | 0.265 | 3.15      |

K-7

|     | 1日    | 2     | 3     | 5     | 6     | アルコール (%) |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| 2%  | 0.025 | 0.058 | 0.075 | 0.103 | 0.119 | 1.11      |
| 5%  | 0.047 | 0.121 | 0.169 | 0.209 | 0.216 | 2.69      |
| 10% | 0.039 | 0.100 | 0.172 | 0.230 | 0.334 | 5.61      |
| 20% | 0.038 | 0.165 | 0.198 | 0.360 | 0.432 | 7.03      |

表中、各グルコース濃度におけるCO<sub>2</sub>ガス流量(g)を認む。

第4表より、本発明酵母No.133は、生育能および発酵能に関しては、醸造用酵母(K-7)にほぼ近い性質を有することが判明した。

グルタチオンの漏出性

次に、白米による醸造を行う前に、白糠を用いた糖化液において本発明酵母の性質を調べた。白糠糖化液(第6表参照)中に、酵母菌体を同数接種し、13°Cで静置培養を行い、発酵能および菌体内生理活性成分の1つとして、グルタチオンの漏出能について経時的に測定した。なお、白米糖化液は、精米歩合70%の米を粉砕したものを、白糠糖化液は精米歩合80%〜75%の間に生じる糠を使用し、各7を浸水歩合250%において酵素剤(プロテアーゼMアミノ、元野製薬(株)製)を用いて調製した。

第5表 アルコールの生成経過(%)

|        | 2日   | 6    | 9              | 16              | 22              |
|--------|------|------|----------------|-----------------|-----------------|
| No.133 | 1.28 | 4.42 | 7.08<br>(0.23) | 10.73<br>(0.40) | 18.18<br>(1.93) |
| KI-12B | 0.03 | 0.06 | 0.13<br>(0.37) | 0.38<br>(0.60)  | 0.61<br>(1.22)  |
| K-7    | 1.34 | 5.00 | 7.68<br>(0.16) | 12.74<br>(0.18) | 13.80<br>(0.63) |

( )内はグルタチオン量(%)

第6表 糖化液中の含窒アミノ酸およびグルタチオン含量アミノ酸含量

|       | システイン | メチオニン | グルタミン酸 | グリシン |
|-------|-------|-------|--------|------|
| 白米糖化液 | 0.19  | 1.36  | 1.50   | 0.98 |
| 白糠糖化液 | 0     | 0.62  | 0.69   | 0.52 |

(浸水歩合250%、表中単位は%)

白米糖化液中には、グルタチオン生合成の基質となり得る含窒アミノ酸の含有量が少ないにもかかわらず、(第6表参照)、No.133はグルタチオンを漏出しており、そのグルタチオン漏出能は、新株である醸造形成能欠損酵母(KI-197-12B)に匹敵する能力を備えたものであった(第5表)。また、発酵能は、KI-197-12Bとは異なりもう1つの親株であるK-7と同程度の能力を有していた(第5表)。

さらに、原料中の基質アミノ酸含有量から推定すると、白米を原料として用いることにより、さらにグルタチオン濃度が上昇することも予想できた。

以上の測定より、本発明の酵母は、酒類醸造の適性を待

ち、さらに酵母菌体内に生産、貯蔵されるグルタチオンを菌体外に漏出する新規な性質を有するものであることが確認された。従って、この酵母を酒類製造に用いることにより、グルタチオン含有清酒が製造できると考えられた。

そこで、この新規な酵母を用いて小仕込試験を行うこととした。

#### 実施例2 小仕込試験

本実施例では、常法に従い、2段仕込みによる清酒製造を行った。仕込配合および発酵経過を第7表、第8表に示す。

第7表 仕込配合

| 原料     | 1日目               | 2日目  | 5日目(留) | 合計    |
|--------|-------------------|------|--------|-------|
| 粳米(g)  | 41.7              | 20.3 | 138.0  | 200   |
| 糯米(g)  | —                 | 20.3 | 138.0  | 158.3 |
| 麹米(g)  | 41.7              | —    | —      | 41.7  |
| 乳酸(g)  | 0.192             | —    | —      | 0.192 |
| 汲水(ml) | 240               | —    | 40     | 280   |
| 酵母(コ)  | $4.8 \times 10^4$ | —    | —      | —     |

(留)：留仕込み(以下、同じ)

第8表 仕込み結果

|            | CO <sub>2</sub> 発生量(g) |     |     | 上槽日 | アルコール(%) | グルタチオン(mg) | 酸度(ml) | アミノ酸度 |
|------------|------------------------|-----|-----|-----|----------|------------|--------|-------|
|            | 留                      | 11日 | 上槽前 |     |          |            |        |       |
| No.133     | 28                     | 51  | 58  | 20  | 17.2     | 16.14      | 2.20   | 3.01  |
| KL-197-12B | 17                     | 33  | 42  | 22  | 11.0     | 3.66       | 2.80   | 3.86  |
| K-7        | 45                     | 63  | 73  | 18  | 19.6     | 1.35       | 2.97   | 1.15  |

\* 留仕込の日を1日目とする(以下、同じ)

第8表より、本発明酵母を用いると、従来から一般的に使用されている醸造用酵母(K-7)で仕込んだ酒よりもグルタチオンの含有量は10倍以上も多くなることが分かる。また、グルタチオンの漏出量も白飯糖化数で行ったときよりも多いものであった(第5表参照)。一方、液胞形成能欠損株の親株であるKL-197-12Bは、生育および発酵能力が乏しく、十分なグルタチオンの漏出およびアルコールの生成が認められなかった。

さらに、上槽後のきき酒により、本発明酵母(No.133)により製造した酒は、従来の醸造用酵母(K-7)により製造した酒の酒質と比べても劣ることはなく、かつ、自己消化臭などの異臭、異味は全く感じられないことが判明した。

以上、本発明の酵母を用いることにより、グルタチオンを従来酒よりも高濃度に含有した酒類を製造できること

が分かる。

そこで、以下の実施例においてスケールアップして製造を試みた。

#### 実施例3 二段仕込

本実施例では、通常の条件に従い、粳米400gの2段仕込を行った。仕込配合および仕込結果を第9表および第10表に示す。

第9表 仕込配合

| 原料     | 1日目               | 2日目  | 5日目(留) | 合計    |
|--------|-------------------|------|--------|-------|
| 粳米(g)  | 83.4              | 40.6 | 276.0  | 400   |
| 糯米(g)  | —                 | 40.6 | 276.0  | 316.6 |
| 麹米(g)  | 83.4              | —    | —      | 83.4  |
| 乳酸(g)  | 0.384             | —    | —      | 0.384 |
| 汲水(ml) | 480               | —    | 80     | 560   |
| 酵母(コ)  | $9.6 \times 10^4$ | —    | —      | —     |

第10表 仕込み結果

|        | CO <sub>2</sub> 発生量(g) |     |     | 上槽日 | アルコール(%) | グルタチオン(mg) | 酸度(ml) | アミノ酸度 |
|--------|------------------------|-----|-----|-----|----------|------------|--------|-------|
|        | 留                      | 12日 | 上槽前 |     |          |            |        |       |
| No.133 | 15                     | 99  | 100 | 17  | 15.8     | 20.88      | 3.12   | 3.40  |
| K-7    | 29                     | 116 | 123 | 17  | 19.6     | 2.78       | 3.66   | 1.86  |

粳米400gの二段仕込においても、粳米200g(第8表)と同様に本発明の酵母(No.133)で仕込んだ酒は、順調な発酵経過を示しアルコール生成量も充分であった。グルタチオン漏出量においても、本発明酒は従来の醸造用酵母(K-7)で仕込んだ酒よりもグルタチオンを多く含有したものであり、かつきき酒における品質面の鑑定でも自己消化臭などの異臭、異味は感じられなかった。このように、二段仕込において、本発明の酵母を用いた場合には所望の酒類が得られた。

#### 実施例4 三段仕込

本実施例では、通常の清酒の仕込みに用いられる三段仕込を行った。

第11表 仕込配合

| 原料     | 水廻                | 添仕込  | 仲仕込  | 留仕込   | 合計    |
|--------|-------------------|------|------|-------|-------|
| 粳米(g)  | 10.0              | 30.0 | 60.0 | 160.0 | 200.0 |
| 糯米(g)  | —                 | 30.0 | 60.0 | 82.0  | 160.0 |
| 麹米(g)  | 10.0              | —    | 12.0 | 18.0  | 40.0  |
| 乳酸(g)  | 0.192             | —    | —    | —     | 0.192 |
| 汲水(ml) | 60.0              | —    | 74.0 | 146.0 | 280.0 |
| 酵母(コ)  | $1.2 \times 10^4$ | —    | —    | —     | —     |

第12表 仕込み結果

| 上<br>槽<br>目 | CO <sub>2</sub> 減量(g) |         |         | 上<br>槽<br>目 | アル<br>コ<br>ール<br>(%) | グル<br>タ<br>チ<br>オン<br>(mg) | 酸度<br>(ml) | アミ<br>ノ<br>酸<br>度<br>(ml) |
|-------------|-----------------------|---------|---------|-------------|----------------------|----------------------------|------------|---------------------------|
|             | 11<br>日               | 12<br>日 | 13<br>日 |             |                      |                            |            |                           |
| Na133       | 21                    | 50      | 55      | 20          | 15.3                 | 15.08                      | 2.80       | 2.80                      |
| K-7         | 37                    | 61      | 63      | 13          | 17.3                 | 1.64                       | 3.16       | 1.15                      |

本発明の酵母を用いて3段仕込を行った結果、2段仕込  
みにおける結果と同様に（第8表、第10表参照）、K-  
7よりもグルタチオンを多く含んだ酒を製造することが  
できた。また、さき酒の結果においても同様に、従来の  
醸造用酵母（K-7）により製造した酒と比べ劣ること  
はなく、かつ、自己消化臭などの異臭、異味は全く認め  
られなかった。

このように、通常の精酒の仕込み配合による醸造にお  
いても本発明の酵母を用いると所望のグルタチオン含有  
精酒が得られることが判明した。

#### 実施例5 醸造過程および生理活性成分

本実施例では、本発明の酵母の総米400gの2段仕込を行  
い、醸造過程ならびにグルタチオン以外の生理活性成分の  
含有量についても記載する。

第13表 Na133醸造経過

| 上<br>槽<br>目 | グルタ<br>チオン<br>(mg) | アルコ<br>ール<br>(%) | CO <sub>2</sub> 減量<br>(g) | 紫外部吸収             |                   | アミ<br>ノ<br>酸<br>度<br>(ml) |
|-------------|--------------------|------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
|             |                    |                  |                           | OD <sup>250</sup> | OD <sup>280</sup> |                           |
| 1           | 6.88               | 7.63             | 3.10                      | 0.439             | 0.442             | 0.80                      |
| 4           | 3.30               | 8.25             | 6.56                      | 0.348             | 0.366             | 0.80                      |
| 7           | 3.84               | 13.81            | 9.03                      | 0.266             | 0.285             | 0.65                      |
| 3           | 3.54               | 14.40            | 10.15                     | 0.514             | 0.516             | 0.70                      |
| 9           | 3.18               | 15.02            | 10.70                     | 0.540             | 0.540             | 0.90                      |
| 11          | 4.83               | 16.04            | 11.50                     | 0.627             | 0.594             | 0.91                      |
| 12          | 8.51               | 16.47            | 11.66                     | 0.712             | 0.606             | 1.20                      |
| 13          | 13.64              | 17.17            | 11.63                     | 0.738             | 0.657             | 1.20                      |
| 14          | 15.86              | 17.00            | 12.36                     | 0.871             | 0.742             | 1.52                      |
| 15          | 18.19              | 17.19            | 12.29                     | 0.860             | 0.717             | 1.39                      |
| 16          | 18.55              | 16.75            | 14.28                     | 1.012             | 0.840             | 1.68                      |
| 18          | 20.72              | 17.09            | 14.25                     | 0.981             | 0.783             | 1.70                      |

第14表 K-7醸造経過

| 上<br>槽<br>目 | グルタ<br>チオン<br>(mg) | アルコ<br>ール<br>(%) | CO <sub>2</sub> 減量<br>(g) | 紫外部吸収             |                   | アミ<br>ノ<br>酸<br>度<br>(ml) |
|-------------|--------------------|------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
|             |                    |                  |                           | OD <sup>250</sup> | OD <sup>280</sup> |                           |
| 1           | 0.77               | 8.23             | 3.32                      | 0.367             | 0.288             | 0.45                      |
| 4           | 1.99               | 10.06            | 6.81                      | 0.344             | 0.371             | 0.25                      |
| 7           | 1.75               | 14.69            | 9.88                      | 0.277             | 0.302             | 0.45                      |
| 8           | 1.38               | 15.35            | 10.35                     | 0.488             | 0.521             | 0.45                      |
| 9           | 1.07               | 15.87            | 11.59                     | 0.539             | 0.554             | 0.70                      |

| 上<br>槽<br>目 | グルタ<br>チオン<br>(mg) | アルコ<br>ール<br>(%) | CO <sub>2</sub> 減量<br>(g) | 紫外部吸収             |                   | アミ<br>ノ<br>酸<br>度<br>(ml) |
|-------------|--------------------|------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
|             |                    |                  |                           | OD <sup>250</sup> | OD <sup>280</sup> |                           |
| 11          | 1.20               | 17.16            | 11.95                     | 0.642             | 0.650             | 0.80                      |
| 12          | 1.22               | 17.42            | 12.00                     | 0.649             | 0.657             | 0.79                      |
| 13          | 1.59               | 18.14            | 12.88                     | 0.883             | 0.875             | 0.50                      |
| 14          | 1.83               | 18.41            | 13.75                     | 0.982             | 0.878             | 0.75                      |
| 15          | 1.83               | 18.98            | 15.19                     | 0.923             | 0.898             | 0.80                      |
| 16          | 2.04               | 19.11            | 14.28                     | 0.857             | 0.799             | 1.00                      |
| 18          | 3.26               | 18.97            | 16.63                     | 1.007             | 0.916             | 1.09                      |

本発明酵母による仕込の結果、酵母の発酵に際してアル  
コールの生成とともに醸造中期以降に酒中にグルタチオ  
ンを蓄積していることが認められた（第13表）。一方、  
従来の酵母（K-7）ではグルタチオンの酒中への漏出  
は極めて少ないものである（第14表）。

今回、本発明により製造される酒は、従来の酒に比べ酒  
中に他の生理活性成分を多く含むことが判明したが、こ  
れを以下の測定結果により示す。

まず、醸造中の紫外部吸収値（OD<sup>250</sup>、OD<sup>280</sup>および核  
酸の純度（OD<sup>250</sup>/OD<sup>280</sup>）を示す。

第15表 紫外部吸収の経過

|    | Na133             |                   |       | K-7               |                   |       |
|----|-------------------|-------------------|-------|-------------------|-------------------|-------|
|    | OD <sup>250</sup> | OD <sup>280</sup> | 比     | OD <sup>250</sup> | OD <sup>280</sup> | 比     |
| 1日 | 0.439             | 0.442             | 0.993 | 0.387             | 0.398             | 0.977 |
| 4  | 0.348             | 0.366             | 0.951 | 0.344             | 0.371             | 0.927 |
| 7  | 0.266             | 0.265             | 0.933 | 0.277             | 0.302             | 0.917 |
| 8  | 0.514             | 0.516             | 0.986 | 0.488             | 0.521             | 0.937 |
| 9  | 0.540             | 0.540             | 1.000 | 0.539             | 0.554             | 0.973 |
| 11 | 0.627             | 0.594             | 1.056 | 0.642             | 0.650             | 0.988 |
| 12 | 0.712             | 0.600             | 1.187 | 0.649             | 0.657             | 0.988 |
| 13 | 0.738             | 0.657             | 1.123 | 0.833             | 0.875             | 0.952 |
| 14 | 0.871             | 0.742             | 1.174 | 0.892             | 0.876             | 1.018 |
| 15 | 0.860             | 0.717             | 1.199 | 0.923             | 0.898             | 1.033 |
| 16 | 1.012             | 0.840             | 1.205 | 0.857             | 0.799             | 1.073 |
| 18 | 0.981             | 0.783             | 1.253 | 1.007             | 0.916             | 1.099 |

表中、「比」とあるのはOD<sup>250</sup>/OD<sup>280</sup>値を示す。

40 本発の酵母に仕込において、醸中の核酸の吸収を示すOD<sup>250</sup>の値、および核酸の純度を示すOD<sup>250</sup>/OD<sup>280</sup>の値の増加が認められた（第15表）。これら核酸の増加の原因は、菌体の自己消化か菌体の破壊によるものと考えられる。しかしながら、酵母の自己消化に適合する異臭が全く認められなかったことから、漏出は自己消化によるものではなく菌体の破壊によるものと考えられる。従って、本発明の酵母においては、参考例1に記載した酵母菌体内の物質輸送の異常により起こる菌体内成分の菌体外漏出と、さらに、本実施例の第15表より考えられる醸の変化と共に生じる酵母菌体外の浸透圧変化による

菌自体の破壊の両方によって、酵母菌体内の有用生理活性成分の抽出が行われていると判断される。

その他の生理活性成分の例として、以下にアミノ酸、ビタミンについて測定した結果を示す。

#### 1) アミノ酸

測定方法：二段仕込みにあける酵母数18日目の遠液を日立アミノ酸アナライザーを用いて分析した。

第16表 アミノ酸組成

|          | 株133 2段仕込    | K-7 2段仕込     |
|----------|--------------|--------------|
| アスパラギン酸  | 7.73 (2.6)   | 1.14 (0.9)   |
| スレオニン    | 16.53 (5.5)  | 9.39 (7.6)   |
| セリン      | 9.89 (3.3)   | 2.68 (2.2)   |
| グルタミン酸   | 35.38 (11.7) | 11.19 (9.1)  |
| グリシン     | 18.06 (6.0)  | 5.94 (4.8)   |
| アラニン     | 30.32 (10.3) | 9.15 (7.4)   |
| シスチン     | 3.34 (1.1)   | 1.12 (0.9)   |
| バリン      | 17.22 (5.7)  | 4.39 (3.5)   |
| メチオニン    | 1.30 (0.4)   | 0.64 (0.5)   |
| イソロイシン   | 7.92 (2.6)   | 1.99 (1.6)   |
| ロイシン     | 20.33 (6.9)  | 8.48 (6.9)   |
| チロシン     | 14.65 (4.9)  | 4.82 (4.0)   |
| フェニルアラニン | 16.48 (5.5)  | 6.65 (5.6)   |
| γ-ABA    | 3.42 (1.1)   | 0.20 (0.2)   |
| オルニチン    | 4.88 (1.6)   | 2.54 (2.1)   |
| リジン      | 14.29 (4.7)  | 6.37 (5.2)   |
| エタノールアミン | 6.96 (2.3)   | 5.16 (4.2)   |
| ヒスチジン    | 5.76 (1.9)   | 3.02 (2.4)   |
| トリプトファン  | 1.37 (0.5)   | 0.00 (0.0)   |
| アルギニン    | 52.40 (17.4) | 23.82 (19.3) |
| プロリン     | 12.16 (4.0)  | 13.63 (11.0) |
| アンモニア    | 0.00 (0.0)   | 0.95 (0.8)   |
| 合計       | 301.49(100%) | 123.41(100%) |

表中の単位：mg/100ml、( )：%表示

γ-ABA：γ-アミノ酪酸

第16表に示すごとく、本発明の酒には、従来の酒に比べて約3倍のアミノ酸が含有される。また、各アミノ酸の含有比も従来のものとほとんど差はなくバランスがとれたものである。

#### 2) ビタミン

測定方法：2段仕込における上格酒中のチアミンを、チオホ

\*クローム法により測定した。

第17表 チアミン測定

|      | 株133 | K-7 |
|------|------|-----|
| チアミン | 12   | 2   |

表中単位はmg/ml

第17表に示すごとく、本発明の製法による酒はK-7酒に比べてチアミンの含有量が多い。このチアミンは、本発明の酵母菌体内のみで生産、貯蔵され、菌体外には抽出されないものであるから、本発明の酵母はこのような生理活性成分まで抽出する優れた抽出能を有することが確認される。

#### 発明の効果

本発明により、通常の酒類醸造に用いられる酵母に匹敵する発酵能を有し、グルタチオンその他の生理活性成分の抽出量が多い酵母が提供される。また、この酵母を用いることにより、通常の清酒の仕込配合、および従来の製法では製造することができなかった、菌体内で生産、貯蔵される種々の生理活性成分を多く含み、かつ、品質にも優れた酒類を製造する方法が提供される。

フロントページの続き

(72)発明者 神田 昌敏

兵庫県川西市水明台2丁目1番75号

(72)発明者 浜地 正昭

兵庫県神戸市北区武蔵ヶ丘4丁目3番5号

(5)

特公平6-75500

(72)発明者 本居 健光  
兵庫県宝塚市光方丘1丁目2番26号

(72)発明者 市川 弥太郎  
兵庫県芦屋市平田町2番26号



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**